

14. 9. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

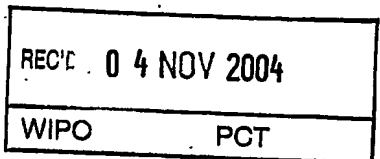
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 9月 8日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-315797
[ST. 10/C]: [JP2003-315797]

出 願 人
Applicant(s): 東洋紡績株式会社

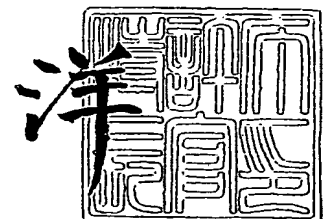


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3094860

【書類名】 特許願
【整理番号】 CN03-0611
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ
 研究所内
 【氏名】 竹嶋 誠嗣
【発明者】
 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ
 研究所内
 【氏名】 松村 肇庸
【発明者】
 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ
 研究所内
 【氏名】 岸本 高英
【発明者】
 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ
 研究所内
 【氏名】 岡 正則
【特許出願人】
 【識別番号】 000003160
 【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社
 【代表者】 津村 準二
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2003- 80244
 【出願日】 平成15年 3月24日
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2003- 80310
 【出願日】 平成15年 3月24日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 000619
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (PQQGDH) よりも二糖類に対する作用性が低下した、及び／又は、安定性が向上した改変型 PQQGDH。

【請求項 2】

配列番号 1 に記載される PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、グルコースの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸が置換されている、請求項 1 に記載の改変型 PQQGDH。

【請求項 3】

配列番号 1 に記載される PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、カルシウムイオンの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸が置換されている、請求項 1 に記載の改変型 PQQGDH。

【請求項 4】

野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (PQQGDH) よりも安定性が向上した改変型 PQQGDH。

【請求項 5】

請求項 1～4 のいずれかに記載の改変型 PQQGDH をコードする遺伝子。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の形質転換体を培養することを特徴とする改変型 PQQGDH の製造法。

【請求項 9】

請求項 1～4 のいずれかに記載の改変型 PQQGDH を含むグルコースアッセイキット。

【請求項 10】

請求項 1～4 のいずれかに記載の改変型 PQQGDH を含むグルコースセンサー。

【請求項 11】

請求項 1～4 のいずれかに記載の改変型 PQQGDH を含むグルコース測定方法。

【請求項 12】

野生型酵素の活性型立体構造における活性中心から半径 15 Å 以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる請求項 1 に記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

【請求項 13】

野生型酵素の活性型立体構造において基質の 1 位の炭素に結合する OH 基から半径 10 Å 以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる請求項 1 に記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

【請求項 14】

野生型酵素の活性型立体構造において基質の 2 位の炭素に結合する OH 基から半径 10 Å 以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる請求項 1 に記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

【書類名】明細書

【発明の名称】基質特異性または安定性に優れたピロロキノリンキノン（PQQ）依存性グルコースデヒドロゲナーゼ改変体

【技術分野】

【0001】

本発明は基質特異性及び／又は熱安定性が改良された改変型グルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）に関し、詳しくはピロロキノリンキノン（PQQ）を補酵素とする改変型PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（PQQGDH）、その製造法及びグルコースセンサーに関する。

本発明の改変型PQQGDHは、臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

【背景技術】

【0002】

PQQGDHは、ピロロキノリンキノン（PQQ）を補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼである。グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒するから、血糖の測定に用いることができる。血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上きわめて重要な指標である。現在、血中グルコース濃度の測定は、グルコースオキシダーゼを使用したバイオセンサーを用いる方法が主流となっているが、反応が溶存酸素濃度に影響されるから、測定値に誤差が生じる可能性があった。このグルコースオキシダーゼにかわる新たな酵素としてPQQ依存性グルコース脱水素酵素が注目されている。我々のグループは、アシネトバクター・バウマンニ（*Acinetobacter baumannii*） NCIMB11517株が、PQQ依存性グルコース脱水素酵素を産生することを見出し、遺伝子のクローニングならびに高発現系を構築した（特許文献1参照）。PQQ依存性グルコース脱水素酵素はグルコースオキシダーゼに比べて基質特異性、熱安定性に問題点があった。

【特許文献1】特開平11-243949号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、従来技術の課題を背景になされたもので、PQQ-GDHの基質特異性及び／又は熱安定性を課題としてその改良に関するものである。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者らは上記課題を解決するため、鋭意研究した結果、遂に本発明を完成するに至った。即ち本発明は、

1. 野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（PQQGDH）よりも二糖類に対する作用性が低下した、及び／又は、安定性が向上した改変型PQQGDH。

2. 野生型のグルコースデヒドロゲナーゼよりも二糖類に対する作用性が低下したことを特徴とする1.に記載の改変型PQQGDH。

3. 二糖類がマルトースであることを特徴とする2.に記載の改変型PQQGDH。

4. マルトースに対する作用性がグルコースに対する作用性の90%以下であることを特徴とする2.に記載の改変型PQQGDH。

5. 二糖類に対するK_m値が大きくなったことを特徴とする2.に記載の改変型PQQGDH。

6. 二糖類がマルトースであることを特徴とする5.に記載の改変型PQQGDH。

7. マルトースに対するK_m値が8mM以上であることを特徴とする5.に記載の改変型PQQGDH。

8. 二糖類に対するK_m値がグルコースに対するK_m値よりも大きいことを特徴とする2.に記載の改変型PQQGDH。

9. 二糖類がマルトースであることを特徴とする8. 記載の改変型PQQGDH。

10. マルトースに対するKm値がグルコースに対するKm値の1.5倍以上であることを特徴とする8. 記載の改変型PQQGDH。

11. 配列番号1に記載されるPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、グルコースの結合に関与するアミノ酸及び/またはその周辺のアミノ酸が置換されている、2. に記載の改変型PQQGDH。

12. 配列番号1に記載されるPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、カルシウムイオンの結合に関与するアミノ酸及び/またはその周辺のアミノ酸が置換されている、2. に記載の改変型PQQGDH。

13. 配列番号1に記載されるPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、67位、68位、69位、76位、89位、167位、168位、169位、170位、341位、342位、343位、351位、49位、174位、188位、189位、207位、215位、245位、249位、300位、349位、129位、130位及び131位からなる群から選ばれる少なくとも1つの位置のアミノ酸が置換されている、2. に記載の改変型PQQGDH。

14. アミノ酸置換が、Q76N, Q76E, Q76T, Q76M, Q76G, Q76K, N167E, N167L, N167G, N167T, N167S, N167A, N167M, Q168I, Q168V, Q168A, Q168C, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168K, Q168L, Q168M, Q168N, Q168R, Q168S, Q168W, L169D, L169S, L169W, L169Y, L169A, L169N, L169M, L169V, L169C, L169Q, L169H, L169F, L169R, L169K, L169I, L169T, A170L, A170I, A170K, A170F, A170W, A170P, K89E, K300R, S207C, N188I, T349S, K300T, L174F, K49N, S189G, F215Y, S189G, E245D, E245F, E245H, E245M, E245N, E245Q, E245V, E245C, N249G, N249A, N249E, N249Q, A351T, P67K, E68K, P67D, E68T, I69C, P67R, E68R, E129R, K130G, P131G, E129N, P131T, E129Q, K130T, P131R, E129A, K130R, P131K, E341L, M342P, A343R, A343I, E341P, M342V, E341S, M342I, A343C, M342R, A343N, L169P, L169G及びL169Eからなる群から選択される13. に記載の改変型PQQGDH。

15. アミノ酸置換が、Q76N, Q76E, Q76T, Q76M, Q76G, Q76K, Q168I, Q168V, Q168A, Q168C, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168K, Q168L, Q168M, Q168N, Q168R, Q168S, Q168W, L169A, L169V, L169H, L169K, L169D, L169S, L169N, L169G, L169C, A170L, A170I, A170K, A170F, A170W, A170P, E245F, E245H, E245M, E245N, E245Q, E245V, E245C, N249G, N249A, N249E, N249Q, (Q168A+L169G+E245D), (Q168A+L169P+E245D), (K89E+K300R), (Q168A+L169D), (Q168S+L169S), (N167E+Q168G+L169T), (N167S+Q168N+L169R), (Q168G+L169T), (N167G+Q168S+L169Y), (N167L+Q168S+L169G), (N167G+Q168S+L169S+L174F+K49N), (Q168N+L168N+S189R), (N167E+Q168G+L169A+

S189G), (N167G+Q168R+L169A), (N167S+Q168G+L169A), (N167G+Q168V+L169S), (N167S+Q168V+L169S), (N167T+Q168I+L169G), (N167G+Q168W+L169N), (N167G+Q168S+L169N), (N167G+Q168S+L169V), (Q168R+L169C), (N167S+Q168L+L168G), (Q168C+L169S), (N167T+Q168N+L169K), (N167G+Q168T+L169A+S207C), (N167A+Q168A+L169P), (N167G+Q168S+L169G), (N167G+Q168G), (N167G+Q168D+L169K), (Q168P+L169G), (N167G+Q168N+L169S), (Q168S+L169G), (N188I+T349S), (N167G+Q168G+L169A+F215Y), (N167G+Q168T+L169G), (Q168G+L169V), (N167G+Q168V+L169T), (N167E+Q168N+L169A), (Q168R+L169A), (N167G+Q168R), (N167G+Q168T), (N167G+Q168T+L169Q), (Q168I+L169G+K300T), (N167G+Q168A), (N167T+Q168L+L169K), (N167M+Q168Y+L169G), (N167E+Q168S), (N167G+Q168T+L169V+S189G), (N167G+Q168G+L169C), (N167G+Q168K+L169D), (Q168A+L169D), (Q168S+E245D), (Q168S+L169S), (A351T), (N167S+Q168S+L169S), (Q168I+L169Q), (N167A+Q168S+L169S), (Q168S+L169E), (Q168A+L169G), (Q168S+L169P), (P67K+E68K), (P67R+E68R+I69C), (P67D+E68T+I69C), (E129R+K130G+P131G), (E129Q+K130T+P131R), (E129N+P131T), (E129A+K130R+P131K), (E341L+M342P+A343R), (E341S+M342I), A343I, (E341P+M342V+A343C), (E341P+M342V+A343R), (E341L+M342R+A343N), (Q168A+L169A), (Q168A+L169C), (Q168A+L169E), (Q168A+L169F), (Q168A+L169H), (Q168A+L169I), (Q168A+L169K), (Q168A+L169M), (Q168A+L169N), (Q168A+L169P), (Q168A+L169Q), (Q168A+L169R), (Q168A+L169S), (Q168A+L169T), (Q168A+L169V), (Q168A+L169W) 及び (Q168A+L169Y) からなる群から選択され、該アミノ酸置換により基質特異性が向上した13. に記載の改変型PQQGDH。

16. 配列番号1に記載されるPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、428位と429位の間にアミノ酸が挿入されている、2. に記載の改変型PQQGDH。

17. 1. ~ 16. のいずれかに記載の改変型PQQGDHをコードする遺伝子。
18. 17. に記載の遺伝子を含むベクター。
19. 18. に記載のベクターで形質転換された形質転換体。
20. 19. に記載の形質転換体を培養することを特徴とする改変型PQQGDHの製造法。
21. 1. ~ 20. のいずれかに記載の改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキット。
22. 1. ~ 20. のいずれかに記載の改変型PQQGDHを含むグルコースセンサー。
23. 野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (PQQGDH)

DH) よりも安定性が向上した改変型 PQQGDH。

24. 58℃、30分間の熱処理後の活性残存率が48%以上であることを特徴とする23. 記載の改変型 PQQGDH。

25. 58℃、30分間の熱処理後の活性残存率が55%以上であることを特徴とする23. 記載の改変型 PQQGDH。

26. 58℃、30分間の熱処理後の活性残存率が70%以上であることを特徴とする23. 記載の改変型 PQQGDH。

27. 配列番号1に記載される PQQGDH において、20位、76位、89位、168位、169位、246位及び300位からなる群から選ばれる少なくとも1つの位置のアミノ酸が置換されている、23. に記載の PQQGDH。

28. アミノ酸置換が、K20E, Q76M, Q76G, K89E, Q168A, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168M, Q168P, Q168W, Q168Y, Q168S, L169D, L169E, L169P, L169S, Q246H, K300R, Q76N, Q76T, Q76K, L169A, L169C, L169E, L169F, L169H, L169K, L169N, L169Q, L169R, L169T, L169Y及びL169Gからなる群から選択される27. に記載の改変型 PQQGDH。

29. アミノ酸置換が、K20E, Q76M, Q76G, (K89E + K300R), Q168A, (Q168A + L169D), (Q168S + L169S), Q246H, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168M, Q168P, Q168W, Q168Y, Q168S, (Q168S + L169E), (Q168S + L169P), (Q168A+L169A), (Q168A+L169C), (Q168A+L169E), (Q168A+L169F), (Q168A+L169H), (Q168A+L169K), (Q168A+L169N), (Q168A+L169P), (Q168A+L169Q), (Q168A+L169R), (Q168A+L169T), (Q168A+L169Y) 及び (Q168A + L169G) からなる群から選択され、該アミノ酸置換により熱安定性が向上した28. に記載の改変型 PQQGDH。

30. 23. ～29. のいずれかに記載の改変型 PQQGDH をコードする遺伝子。

31. 30. に記載の遺伝子を含むベクター。

32. 31. に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

33. 32. に記載の形質転換体を培養することを特徴とする改変型 PQQGDH の製造法。

34. 23. ～32. のいずれかに記載の改変型 PQQGDH を含むグルコースアッセイキット。

35. 23. ～32. のいずれかに記載の改変型 PQQGDH を含むグルコースセンサー。

36. 23. ～32. のいずれかに記載の改変型 PQQGDH を含むグルコース測定方法。

37. 野生型酵素の活性型立体構造における活性中心から半径15Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる1. に記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

38. 野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる1. 記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

39. 基質がグルコースで有る38. 記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

40. 野生型酵素の活性型立体構造において基質の1位の炭素に結合するOH基から半径10Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる1. 記載の改変

型グルコースデヒドロゲナーゼ。

41. 基質がグルコースである40.記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

42. 野生型酵素の活性型立体構造において基質の2位の炭素に結合するOH基から半径10Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる1.記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

43. 基質がグルコースで有る42.記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼである。

【発明の効果】

【0005】

本発明による改変型PQQGDHは野生型PQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下したもの、および／または、野生型PQQGDHよりも熱安定性の向上した酵素である。本発明による改変型PQQGDHをグルコースアッセイキット及びグルコースセンサに使用することにより、野生型PQQGDHを使用したものよりもより高精度な分析が可能となったり、より安定性の高いグルコースアッセイキット及びグルコースセンサを提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書においては、アミノ酸の位置は、シグナル配列が除かれたアスパラギン酸を1として番号付けする。

【0007】

本発明の改変型PQQGDHは、野生型PQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下したもの、および／または、野生型PQQGDHよりも熱安定性の向上したものを含む。

二糖類としては、マルトース、シュクロース、ラクトース、セロビオースなどが例示され、特にマルトースが例示される。

二糖類に対する作用性とは、二糖類を脱水素する作用を意味する。

本発明の改変型PQQGDHは、二糖類に対する作用性が野生型PQQGDHより低下していれば、グルコースに対する作用性は上昇、不変、低下のいずれであっても本発明の改変型PQQGDHに包含される。

【0008】

本発明の改変型PQQGDHは、グルコース濃度の測定において二糖類に対する作用性が野生型PQQGDHを用いた場合と比較して低下したものである。本発明の改変型PQQGDHは、特にマルトースに対する作用性が低下したものである。マルトースに対する作用性は、好ましくは野生型PQQGDHの90%以下、より好ましくは75%以下、さらに好ましくは60%以下、特に40%以下である。

【0009】

本発明の改変型PQQGDHは、さらに、野生型PQQGDHよりも二糖類に対するKm値が大きくなってよい。特にマルトースに対するKm値が大きくなった改変型PQQGDHが好ましい。マルトースに対するKm値は、好ましくは8mM以上、より好ましくは12mM以上、特に20mM以上である。

【0010】

あるいは、本発明の改変型PQQGDHは、さらに、二糖類に対するKm値がグルコースに対するKm値よりも大きくなってよい。特に、マルトースに対するKm値がグルコースに対するKm値よりも大きい改変型PQQGDHが好ましい。好ましくは、マルトースに対するKm値がグルコースに対するKm値の1.5倍以上、より好ましくは3倍以上である。

ここで、マルトースに対する作用性とは、グルコースを基質としたときと二糖類、特にマルトースを基質としたときの反応速度の相対比%を意味する。

【0011】

熱安定性の向上の程度は、58℃、30分間の熱処理後の活性残存率が野生型PQQGDHよりも高いのが好ましい。活性残存率は、好ましくは48%以上、より好ましくは55%以上、特に70%以上である。

【0012】

基質特異性の改良された本発明の改変型PQQGDHとしては、例えば配列番号1のアミノ酸配列において、67位、68位、69位、76位、89位、167位、168位、169位、170位、341位、342位、343位、351位、49位、174位、188位、189位、207位、215位、245位、249位、300位、349位、129位、130位及び131位の少なくとも1つの位置においてアミノ酸置換を有するGDH及び428位と429位の間にアミノ酸が挿入されているGDHが例示される。

【0013】

好ましくは、Q76N, Q76E, Q76T, Q76M, Q76G, Q76K, N167E, N167L, N167G, N167T, N167S, N167A, N167M, Q168I, Q168V, Q168A, Q168C, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168K, Q168L, Q168M, Q168N, Q168R, Q168S, Q168W, L169D, L169S, L169W, L169Y, L169A, L169N, L169M, L169V, L169C, L169Q, L169H, L169F, L169R, L169K, L169I, L169T, A170L, A170I, A170K, A170F, A170W, A170P, K89E, K300R, S207C, N188I, T349S, K300T, L174F, K49N, S189G, F215Y, S189G, E245D, E245F, E245H, E245M, E245N, E245Q, E245V, E245C, N249G, N249A, N249E, N249Q, A351T, P67K, E68K, P67D, E68T, I69C, P67R, E68R, E129R, K130G, P131G, E129N, P131T, E129Q, K130T, P131R, E129A, K130R, P131K, E341L, M342P, A343R, A343I, E341P, M342V, E341S, M342I, A343C, M342R, A343N, L169P, L169G及びL169Eからなる群から選ばれるアミノ酸置換を有するGDH及び428位と429位の間にL、AまたはKが挿入されているGDHである。67位、68位、69位、76位、89位、167位、168位、169位、341位、342位、343位、351位、49位、174位、188位、189位、207位、215位、245位、300位、349位、129位、130位及び131位の置換は、1ヶ所であってもよく、また複数箇所であってもよい。

【0014】

ここで、「Q76N」は、76位のQ (Gln) をN (Asn) に置換することを意味する。

【0015】

Q76N, Q76E, Q76T, Q76M, Q76G, Q76K, Q168I, Q168V, Q168A, Q168C, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168K, Q168L, Q168M, Q168N, Q168R, Q168S, Q168W, L169A, L169V, L169H, L169K, L169D, L169S, L169N, L169G, L169C, A170L, A170I, A170K, A170F, A170W, A170P, E245F, E245H, E245M, E245N, E245Q, E245V, E245C, N249G, N249A, N249E, N249Q, (Q168A+L169G+E245D), (Q168A+L169P+E245D), (K89E+K300R), (Q168A+L169D), (Q168S+L169S), (N167E+Q168G+L169T), (N

167S+Q168N+L169R), (Q168G+L169T), (N167G+Q168S+L169Y), (N167L+Q168S+L169G), (N167G+Q168S+L169S+L174F+K49N), (Q168N+L168N+S189R), (N167E+Q168G+L169A+S189G), (N167G+Q168R+L169A), (N167S+Q168G+L169A), (N167G+Q168V+L169S), (N167S+Q168V+L169S), (N167T+Q168I+L169G), (N167G+Q168W+L169N), (N167G+Q168S+L169N), (N167G+Q168S+L169V), (Q168R+L169C), (N167S+Q168L+L168G), (Q168C+L169S), (N167T+Q168N+L169K), (N167G+Q168T+L169A+S207C), (N167A+Q168A+L169P), (N167G+Q168S+L169G), (N167G+Q168G), (N167G+Q168D+L169K), (Q168P+L169G), (N167G+Q168N+L169S), (Q168S+L169G), (N188I+T349S), (N167G+Q168G+L169A+F215Y), (N167G+Q168T+L169G), (Q168G+L169V), (N167G+Q168V+L169T), (N167E+Q168N+L169A), (Q168R+L169A), (N167G+Q168R), (N167G+Q168T), (N167G+Q168T+L169Q), (Q168I+L169G+K300T), (N167G+Q168A), (N167T+Q168L+L169K), (N167M+Q168Y+L169G), (N167E+Q168S), (N167G+Q168T+L169V+S189G), (N167G+Q168G+L169C), (N167G+Q168K+L169D), (Q168A+L169D), (Q168S+E245D), (Q168S+L169S), (A351T), (N167S+Q168S+L169S), (Q168I+L169Q), (N167A+Q168S+L169S), (Q168S+L169E), (Q168A+L169G), (Q168S+L169P), (P67K+E68K), (P67R+E68R+I69C), (P67D+E68T+I69C), (E129R+K130G+P131G), (E129Q+K130T+P131R), (E129N+P131T), (E129A+K130R+P131K), (E341L+M342P+A343R), (E341S+M342I), A343I, (E341P+M342V+A343C), (E341P+M342V+A343R), (E341L+M342R+A343N), (Q168A+L169A), (Q168A+L169C), (Q168A+L169E), (Q168A+L169F), (Q168A+L169H), (Q168A+L169I), (Q168A+L169K), (Q168A+L169M), (Q168A+L169N), (Q168A+L169P), (Q168A+L169Q), (Q168A+L169R), (Q168A+L169S), (Q168A+L169T), (Q168A+L169V), (Q168A+L169W) 及び (Q168A+L169Y) の置換及び428位と429位の間へのL、AまたはKの挿入は、PQQGDHの基質特異性の向上に寄与する。ここで、基質特異性とは、グルコースを基質としたときと二糖類、特にマルトースを基質としたときの反応速度の相対比%を意味する。

【0016】

熱安定性の改良された本発明のPQQGDHは、配列番号1のアミノ酸配列において、20位、76位、89位、168位、169位、246位及び300位の少なくとも1つの位置においてアミノ酸置換を有し、好ましくは、K20E, Q76M, Q76G, K89E, Q168A, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168M, Q168P, Q168W, Q168Y, Q168S, L169D, L169E, L169P, L169S, Q246H, K300R, Q76N, Q76T, Q76K, L169A, L169C, L1

69E, L169F, L169H, L169K, L169N, L169Q, L169R, L169T, L169Y及びL169Gからなる群から選ばれるアミノ酸置換を有する。20位、76位、89位、168位、169位、246位及び300位の置換は、1ヶ所であってもよく、複数ヶ所であってもよい。

【0017】

ここで、「K20E」は、20位のK(Lys)をE(Glu)に置換することを意味する。

【0018】

特に、K20E, Q76M, Q76G, (K89E + K300R), Q168A, (Q168A + L169D), (Q168S + L169S), Q246H, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168M, Q168P, Q168W, Q168Y, Q168S, (Q168S + L169E), (Q168S + L169P), (Q168A+L169A), (Q168A+L169C), (Q168A+L169E), (Q168A+L169F), (Q168A+L169H), (Q168A+L169K), (Q168A+L169N), (Q168A+L169P), (Q168A+L169Q), (Q168A+L169R), (Q168A+L169T), (Q168A+L169Y)及び(Q168A + L169G)のアミノ酸置換は、PQQGDHの熱安定性の向上に寄与する。

【0019】

配列番号1で示される改変されるべき野生型PQQGDHタンパク質及び配列番号2で示されるその塩基配列は、公知であり、特開平11-243949号公報に記載されている。

【0020】

また、アシネトバクター・カルコアセティカス(*Acinetobacter calcoaceticus*) LMD79.41株由来の酵素のX線結晶構造解析の結果が報告され、活性中心をはじめとした本酵素の高次構造が明らかとなった(非特許文献1, 2, 3, 4参照)。

【非特許文献1】J. Mol. Biol., 289, 319-333 (1999)

【非特許文献2】PNAS, 96(21), 11787-11791 (1999)

【非特許文献3】The EMBO Journal, 18(19), 5187-5194 (1999)

【非特許文献4】Protein Science, 9, 1265-1273 (2000)

【0021】

本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1に記載されるPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、グルコースの結合に関与するアミノ酸及び/またはその周辺のアミノ酸が置換されているものを含む。

また、本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1に記載されるPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、カルシウムイオンの結合に関与するアミノ酸及び/またはその周辺のアミノ酸が置換されているものを含む。

また、本発明の改変型PQQGDHは、野生型酵素の活性型立体構造における活性中心から半径15 Å以内、好ましくは半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。

また、本発明の改変型PQQGDHは、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。特に、基質がグルコースであるとき、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものが好ましい。

また、本発明の改変型PQQGDHは、野生型酵素の活性型立体構造において基質の1位の炭素に結合するOH基から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異すること

により得られるものを含む。特に、基質がグルコースであるとき、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径 10 Å 以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものが好ましい。

また、本発明の改変型 PQQGDH は、野生型酵素の活性型立体構造において基質の 2 位の炭素に結合する OH 基から半径 10 Å 以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。特に、基質がグルコースであるとき、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径 10 Å 以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものが好ましい。

【0022】

本発明の改変タンパク質の製造方法は、特に限定されないが、以下に示すような手順で製造することが可能である。タンパク質を構成するアミノ酸配列を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報を有する DNA の特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有する DNA が作成される。DNA 中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット (Transformer Mutagenesis Kit; Clontech 製, EXOIII/Mung Bean Deletion Kit; Stratagene 製, QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene 製など) の使用、或いはポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) の利用が挙げられる。

【0023】

作製された改変タンパク質の遺伝情報を有する DNA は、プラスミドと連結された状態にて宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体となる。この際のプラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) を宿主微生物とする場合には pBluescript, pUC18 などが使用できる。宿主微生物としては、例えば、エシェリヒア・コリ W3110、エシェリヒア・コリ C600、エシェリヒア・コリ JM109、エシェリヒア・コリ DH5α などが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換え DNA の移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。更には、市販のコンピテントセル (例えば、コンピテントハイ JM109; 東洋紡績製) を用いても良い。

【0024】

こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養で行うが、工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。培養温度は菌が発育し、改変蛋白質を生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリの場合、好ましくは 20~42℃ 程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変タンパク質が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を終了すればよく、通常は 6~48 時間程度である。培地 pH は菌が発育し改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくは pH 6.0~9.0 程度である。

【0025】

培養物中の改変タンパク質を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し利用すること

もできるが、一般には常法に従って改変タンパク質が培養液中に存在する場合は、濾過、遠心分離などにより、改変タンパク質含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。改変タンパク質が菌体内に存在する場合には、得られた培養物から濾過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加して改変タンパク質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0026】

この様にして得られた改変タンパク質含有溶液を、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。吸着剤或いはゲル濾過剤などによるゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーにより、精製された改変タンパク質を得ることができる。

【0027】

本発明では、配列番号1に示されるPQQGDHの76位、167位、168位、169位、170位および245位に着目し、そのアミノ酸置換体を作成したところ、基質特異性が改善されたPQQGDH改変体を得ることができた。基質特異性に関しては、Q76K, Q168A, A170P, E245D, (Q168A+L169G+E245D), (Q168A+L169P+E245D), (Q168S + L169S), (Q168A + L169D), (Q168S + E245D), (Q168S + L169E), (Q168A + L169G), (Q168S + L169P), (Q168A + L169A), (Q168A + L169C), (Q168A + L169E), (Q168A + L169K), (Q168A + L169M), (Q168A + L169N), (Q168A + L169P), (Q168A + L169S) および (Q168A + L169T) が特に好ましい。

【0028】

本発明では、配列番号1に示されるPQQGDHの20位、76位、89位、168位、169位、246位及び300位に着目し、そのアミノ酸置換体を作成したところ、安定性が改善されたPQQGDH改変体を得ることができた。熱安定性に関する限り、K20E, (K89E + K300R), Q168A, (Q168A + L169D), (Q168S + L169S), (Q168S + L169E), (Q168S + L169P), (Q168A + L169G), Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168M, Q168P, Q168S, Q168W, Q168Y, (Q168A + L169A), (Q168A + L169C), (Q168A + L169E), (Q168A + L169F), (Q168A + L169H), (Q168A + L169K), (Q168A + L169N), (Q168A + L169P), (Q168A + L169Q), (Q168A + L169R), (Q168A + L169T), (Q168A + L169Y) 及びQ246Hの置換が特に望ましい。

【0029】

改変タンパク質は、液状（水溶液、懸濁液等）、粉末、凍結乾燥など種々の形態をとることができる。凍結乾燥法としては、特に制限されるものではなく常法に従って行えばよい。本発明の酵素を含む組成物は凍結乾燥物に限られず、凍結乾燥物を再溶解した溶液状態であってもよい。また、グルコース測定を行なう際には、グルコースアッセイキット、グルコースセンサーなどの種々の形態をとることができる。この様にして得られた精製された改変タンパク質は、以下のような方法により安定化することができる。

【0030】

精製された改変タンパク質に（1）アスパラギン酸、グルタミン酸、 α -ケトグルタル

酸、リンゴ酸、 α -ケトグルコン酸、 α -サイクロデキストリンおよびそれらの塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の化合物および(2) アルブミンを共存せしめることにより、改変タンパク質をさらに安定化することができる。

凍結乾燥組成物中においては、PQQGDH含有量は、酵素の起源によっても異なるが、通常は約5~50% (重量比) の範囲で好適に用いられる。酵素活性に換算すると、100~2000 U/mg の範囲で好適に用いられる。

アスパラギン酸、グルタミン酸、 α -ケトグルタル酸、リンゴ酸、及び α -ケトグルコン酸の塩としては、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、及びマグネシウム等の塩が挙げられるが特に限定されるものではない。上記化合物とその塩及び α -サイクロデキストリンの添加量は、1~90% (重量比) の範囲で添加することが好ましい。これらの物質は単独で用いてもよいし、複数組み合わせてもよい。

含有される緩衝液としては特に限定されるものではないが、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、GOOD緩衝液などが挙げられる。該緩衝液のpHは5.0~9.0程度の範囲で使用目的に応じて調整される。凍結乾燥物中においては緩衝剤の含有量は、特に限定されるものではないが、好ましくは0.1% (重量比) 以上、特に好ましくは0.1~30% (重量比) の範囲で使用される。

使用できるアルブミンとしては、牛血清アルブミン(BSA)、卵白アルブミン(OVA)などが挙げられる。特にBSAが好ましい。該アルブミンの含有量は、好ましくは1~80% (重量比)、より好ましくは5~70% (重量比) の範囲で使用される。

組成物には、さらに他の安定化剤などをPQQGDHの反応に特に悪い影響を及ぼさないような範囲で添加してもよい。本発明の安定化剤の配合法は特に制限されるものではない。例えばPQQGDHを含む緩衝液に安定化剤を配合する方法、安定化剤を含む緩衝液にPQQGDHを配合する方法、あるいはPQQGDHと安定化剤を緩衝液に同時に配合する方法などが挙げられる。

【0031】

また、カルシウムイオンと特定のアミノ酸を併用しても安定化効果が得られる。すなわち、(1) カルシウムイオンまたはカルシウム塩、および(2) グルタミン酸、グルタミンおよびリジンからなる群から選択されたアミノ酸を含有させることにより、改変タンパク質を安定化させることができる。

カルシウム塩としては、塩化カルシウムまたは酢酸カルシウムもしくはクエン酸カルシウム等の無機酸または有機酸のカルシウム塩などが例示される。また、水性組成物において、カルシウムイオンの含有量は、 1×10^{-4} ~ 1×10^{-2} Mであることが好ましい。カルシウムイオンまたはカルシウム塩のみを含有させた場合、安定性にわずかな効果が見られるが、さらに下記アミノ酸を含有させることにより、安定性がさらに向上する。

グルタミン酸、グルタミンおよびリジンからなる群から選択されるアミノ酸は、1種または2種以上であってもよい。前記の水性組成物において、グルタミン酸、グルタミンおよびリジンからなる群から選択されたアミノ酸の含有量は、0.01~0.2重量%であることが好ましい。

さらに血清アルブミンを含有させてもよい。前記の水性組成物に血清アルブミンを添加する場合、その含有量は0.05~0.5重量%であることが好ましい。

緩衝剤としては、通常のもので使用され、通常、組成物のpHを5~10とするものが好ましい。具体的にはトリス塩酸、ホウ酸、グッド緩衝液が用いられるが、カルシウムと不溶性の塩を形成しない緩衝液はすべて使用できる。

前記の水性組成物には、必要により他の成分、例えば界面活性剤、安定化剤、賦形剤などを添加しても良い。

【0032】

本発明においては以下の種々の方法によりグルコースを測定することができる。

グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少

なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

【0033】

グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQGDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロックする。

【0034】

グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよびCaCl₂、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

【実施例】

【0035】

以下、本発明を実施例に基づきより詳細に説明する。

実施例1：PQQ依存性グルコース脱水素酵素遺伝子の発現プラスミドの構築

野生型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の発現プラスミドpNPG5は、ベクターpBluescript SK(-)のマルチクロニング部位にアシネトバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii) NCIMB11517株由来のPQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする構造遺伝子を挿入したものである。その塩基配列を配列表の配列番号2に、また該塩基配列から推定されるPQQ依存性グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

【0036】

実施例2：変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の作製

野生型PQQ依存性グルコース脱水素酵素遺伝子を含む組換えプラスミドpNPG5と配列番号3記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE製)を用いて、そのプロトコルに従って変異処理操作を行い、更に塩基配列を決定して、配列番号2記載のアミノ酸配列の76番目のグルタミンがアスパラギンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M1)を取得した。

pNPG5と配列番号4記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の76番目のグルタミンがグルタミン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコー

ドする組換えプラスミド (pNPG5M2) を取得した。

pNPG5 と配列番号 5 記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号 2 記載のアミノ酸配列の 76 番目のグルタミンがスレオニンに置換された変異型 PQQ 依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5M3) を取得した。

pNPG5 と配列番号 6 記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号 2 記載のアミノ酸配列の 76 番目のグルタミンがメチオニンに置換された変異型 PQQ 依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5M4) を取得した。

pNPG5 と配列番号 7 記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号 2 記載のアミノ酸配列の 76 番目のグルタミンがグリシンに置換された変異型 PQQ 依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5M5) を取得した。

pNPG5 と配列番号 8 記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号 2 記載のアミノ酸配列の 76 番目のグルタミンがリジンに置換された変異型 PQQ 依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5M6) を取得した。

pNPG5 と配列番号 9 記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号 2 記載のアミノ酸配列の 168 番目のグルタミンがイソロイシンに置換された変異型 PQQ 依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5M7) を取得した。

pNPG5 と配列番号 10 記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号 2 記載のアミノ酸配列の 168 番目のグルタミンがバリンに置換された変異型 PQQ 依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5M8) を取得した。

pNPG5 と配列番号 11 記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号 2 記載のアミノ酸配列の 168 番目のグルタミンがアラニンに置換された変異型 PQQ 依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5M9) を取得した。

pNPG5 と配列番号 22 記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号 2 記載のアミノ酸配列の 20 番目のリジンがグルタミン酸に置換された変異型 PQQ 依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5M10) を取得した。

pNPG5 と配列番号 23 記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号 2 記載のアミノ酸配列の 89 番目のリジンがグルタミン酸に置換された変異型 PQQ 依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミドを取得した。更にこのプラスミドと配列番号 24 記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号 2 記載のアミノ酸配列の 89 番目のリジンがグルタミン酸に、300 番目のリジンがアルギニンに置換された変異型 PQQ 依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5M11) を取得した。

pNPG5 と配列番号 25 記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号 2 記載のアミノ酸配列の 246 番目のグルタミンがヒスチジンに置換された変異型 PQQ 依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5M12) を取得した。

pNPG5 と配列番号 26 記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号 2 記載のアミノ酸配列の 168 番目のグルタミンがセリンに、169 番目のロイシンがセリンに置換された変異型 PQQ 依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド (pNPG5M13) を取得した。

pNPG5と配列番号27記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがアスパラギン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M14)を取得した。

pNPG5と配列番号66記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがセリンに、169番目のロイシンがグルタミン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M15)を取得した。

pNPG5と配列番号67記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがセリンに、169番目のロイシンがプロリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M16)を取得した。

pNPG5と配列番号68記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがグリシンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M17)を取得した。

pNPG5、pNPG5M1、pNPG5M2、pNPG5M3、pNPG5M4、pNPG5M5、pNPG5M6、pNPG5M7、pNPG5M8、pNPG5M9、pNPG5M10、pNPG5M11、pNPG5M12、pNPG5M13、pNPG5M14、pNPG5M15、pNPG5M16、pNPG5M17の各組換えプラスミドで大腸菌コンピテントセル(エシェリヒア・コリ J M109; 東洋紡績製)を形質転換し、該形質転換体をそれぞれ取得した。

【0037】

実施例3: シュードモナス属細菌で複製できる発現ベクターの構築

実施例2で得た組換えプラスミドpNPG5M1のDNA 5 μ gを制限酵素BamHIおよびXhoI(東洋紡績製)で切断して、変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の構造遺伝子部分を単離した。単離したDNAとBamHIおよびXhoIで切断したpTM33(1 μ g)とをT4DNAリガーゼ1単位で16 $^{\circ}$ C、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリDH5 α のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られた発現プラスミドをpNPG6M1と命名した。

pNPG5、pNPG5M2、pNPG5M3、pNPG5M4、pNPG5M5、pNPG5M6、pNPG5M7、pNPG5M8、pNPG5M9、pNPG5M10、pNPG5M11、pNPG5M12、pNPG5M13、pNPG5M14、pNPG5M15、pNPG5M16、pNPG5M17の各組換えプラスミドについても上記方法と同様にして発現プラスミドを取得した。得られた発現プラスミドそれぞれpNPG6、pNPG6M2、pNPG6M3、pNPG6M4、pNPG6M5、pNPG6M6、pNPG6M7、pNPG6M8、pNPG6M9、pNPG6M10、pNPG6M11、pNPG6M12、pNPG6M13、pNPG6M14、pNPG6M15、pNPG6M16、pNPG6M17と命名した。

【0038】

実施例4: シュードモナス属細菌の形質転換体の作製

シュードモナス・プチダTE3493(微工研寄12298号)をLBG培地(LB培地+0.3%グリセロール)で30 $^{\circ}$ C、16時間培養し、遠心分離(12,000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュウクロースを含む5mMKーリン酸緩衝液(pH7.0)8mlを加え、菌体を懸濁した。再度遠心分離(12,000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシ

ユークロースを含む5mMK-リン酸緩衝液(pH7.0)0.4mlを加え、菌体を懸濁した。

該懸濁液に実施例3で得た発現プラスミドpNPG6M1を0.5 μ g加え、エレクトロポレーション法により形質転換した。100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に生育したコロニーより、目的とする形質転換体を得た。

pNPG6、pNPG6M2、pNPG6M3、pNPG6M4、pNPG6M5、pNPG6M6、pNPG6M7、pNPG6M8、pNPG6M9、pNPG6M10、pNPG6M11、pNPG6M12、pNPG6M13、pNPG6M14、pNPG6M15、pNPG6M16、pNPG6M17の各発現プラスミドについても上記方法と同様にして、該形質転換体をそれぞれ取得した。

【0039】

試験例1

GDH活性の測定方法

測定原理

D-グルコース + PMS + PQQGDH \rightarrow D-グルコノ-1,5-ラクトン + PMS (red)

2 PMS (red) + NTB \rightarrow 2 PMS + ジホルマザン

フェナジンメトサルフェート(PMS) (red) によるニトロテトラゾリウムブルー(NTB)の還元により形成されたジホルマザンの存在は、570nmで分光光度法により測定した。

単位の定義

1単位は、以下に記載の条件下で1分当たりジホルマザンを0.5ミリモル形成させるPQQGDHの酵素量をいう。

(3) 方法

試薬

A. D-グルコース溶液: 0.5M (0.9g D-グルコース (分子量180.16) / 10ml H₂O)

B. PIPES-NaOH緩衝液, pH6.5: 50mM (60mLの水中に懸濁した1.51gのPIPES (分子量302.36)を、5N NaOHに溶解し、2.2mlの10% Triton X-100を加える。5N NaOHを用いて25℃でpHを6.5 \pm 0.05に調整し、水を加えて100mlとした。)

C. PMS溶液: 3.0mM (9.19mgのフェナジンメトサルフェート (分子量817.65) / 10ml H₂O)

D. NTB溶液: 6.6mM (53.96mgのニトロテトラゾリウムブルー (分子量817.65) / 10ml H₂O)

E. 酵素希釈液: 1mM CaCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.1% BSAを含む50mM PIPES-NaOH緩衝液(pH6.5)

手順

遮光ビンに以下の反応混合物を調製し、氷上で貯蔵した(用時調製)

- | | | |
|---------|----------------------|-----|
| 1. 8ml | D-グルコース溶液 | (A) |
| 24. 6ml | PIPES-NaOH緩衝液(pH6.5) | (B) |
| 2. 0ml | PMS溶液 | (C) |
| 1. 0ml | NTB溶液 | (D) |

【0040】

【表 1】

アッセイ混合物中の濃度		
PIPES 緩衝液	42	mM
D-グルコース	30	mM
PMS	0.20	mM
NTB	0.22	mM

【0041】

3. 0 ml の反応混合液を試験管（プラスチック製）に入れ、37℃で5分間予備加温した。

0.1 ml の酵素溶液を加え、穏やかに反転して混合した。

570 nm での水に対する吸光度の増加を37℃に維持しながら分光光度計で4～5分間記録し、曲線の初期直線部分からの1分当たりの ΔOD を計算した（ODテスト）。

同時に、酵素溶液に代えて酵素希釈液（E）加えることを除いては同一の方法を繰り返し、ブランク（ ΔOD ブランク）を測定した。

アッセイの直前に氷冷した酵素希釈液（E）で酵素粉末を溶解し、同一の緩衝液で0.1-0.8 U/ml に希釈した（該酵素の接着性のためにプラスチックチューブの使用が好ましい）。

計算

活性を以下の式を用いて計算する：

$$U/ml = \{ \Delta OD / min (\Delta OD \text{テスト} - \Delta OD \text{ブランク}) \times V_t \times df \} / (0.1 \times 1.0 \times V_s)$$

$$U/mg = (U/ml) \times 1 / C$$

V_t ：総体積（3.1 ml）

V_s ：サンプル体積（1.0 ml）

20.1：ジホルマザンの1/2ミリモル分子吸光係数

1.0：光路長（cm）

df：希釈係数

C：溶液中の酵素濃度（c mg/ml）

【0042】

ホロ型発現精製酵素の調製方法

500 ml の Terrific broth を 2 L 容坂口フラスコに分注し、121℃、20分間オートクレーブを行い、放冷後別途無菌濾過したストレプトマイシンを100 $\mu g/ml$ になるように添加した。この培地に100 $\mu g/ml$ のストレプトマイシンを含むPY培地で予め30℃、24時間培養したシュドモナス・プチダTE3493（pNPG6M1）の培養液を5 ml 接種し、30℃で40時間通気攪拌培養した。培養終了時のPQQ依存性グルコース脱水素酵素活性は、前記活性測定において、培養液1 ml 当たり約120 U/ml であった。

上記菌体を遠心分離により集菌し、20 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）に懸濁した後、超音波処理により破碎し、更に遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。得られた粗酵素液をHiTrap-SP（アマシャム・ファルマシア）イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分離・精製した。次いで10 mM PIPES-NaOH 緩衝液（pH 6.5）で透析した後に終濃度が1 mM になるように塩化カルシウムを添加した。最後にHiTrap-DEAE（アマシャム・ファルマシア）イオン交換カラムクロマトグラ

フィーにより分離・精製し、精製酵素標品を得た。本方法により得られた標品は、SDS-PAGE的にほぼ単一なバンドを示した。

pNPG6、pNPG6M2、pNPG6M3、pNPG6M4、pNPG6M5、pNPG6M6、pNPG6M7、pNPG6M8、pNPG6M9、pNPG6M10、pNPG6M11、pNPG6M12、pNPG6M13、pNPG6M14、pNPG6M15、pNPG6M16、pNPG6M17によるシュードモナス・プチダTE3493形質転換体についても上記方法と同様にして精製酵素標品を取得した。

このようにして取得した精製酵素を用いて性能を評価した。

【0043】

K_m値の測定

上記の活性測定方法に従い、PQQGDHの活性を測定した。グルコースに対するK_m値の測定は、上記活性測定方法の基質濃度を変化させて実施した。また、マルトースに対するK_m値の測定は、上記活性測定方法のグルコース溶液をマルトース溶液に置き換え、グルコースに対するK_m値の測定同様基質濃度を変化させて実施した。結果を表2A表2B、表6、表9及び表14に示す。

【0044】

基質特異性

上記の活性測定方法に従い、PQQGDHの活性を測定した。グルコースを基質溶液とした場合の脱水素酵素活性値とマルトースを基質溶液とした場合の脱水素酵素活性値を測定し、グルコースを基質とした場合の測定値を100とした場合の相対値を求めた。マルトースを基質溶液とした場合の脱水素酵素活性に際しては、0.5Mのマルトース溶液を調製して活性測定に用いた。結果を表2A、表2B、表4、表5、表6、表8、表9、表11、表13及び表14に示す。

【0045】

熱安定性の測定

各種PQQGDHを酵素濃度5U/ml、緩衝液(1mM CaCl₂、1μM PQQを含む10mM PIPES-NaOH (pH6.5) 中で保存し、58℃で熱処理後の活性残存率を求めた。結果を表2A、表2B、表6、表9及び表14に示す。なお、熱処理を行なった時間は、表2Bの試験のみ30分間、その他の試験は20分間である。

【0046】

至適pHの測定

0.22% Triton-X100を含む50mMリン酸緩衝液(pH5.0~8.0)、0.22% Triton-X100を含む50mM 酢酸緩衝液(pH3.0~6.0)、0.22% Triton-X100を含む50mM PIPES-NaOH緩衝液(pH6.0~7.0)、0.22% Triton-X100を含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH7.0~9.0) 中で酵素活性を測定した。結果を図1に示す。また、最も高い活性を示したpHを表2Aに示す。

【0047】

【表 2】

A

変異	比活性	基質 特異性	Km (Mal)	Km (Glc)	至適 pH	熱安定性
Q76N	49	66%	13.6	3.1	6.4	49.1%
Q76E	36	68%	13.6	3.7	5.6	42.5%
Q76T	32	84%	10.3	2.5	6.4	49.0%
Q76M	108	81%	8.7	2.2	6.4	55.3%
Q76G	32	84%	10.6	2.2	6.4	58.5%
Q76K	84	32%	29.9	7.9	6.8	48.4%
Q168I	231	69%	11.9	5.3	6.8	27.3%
Q168V	377	71%	13.0	6.4	6.4	32.2%
Q168A	333	37%	35.3	10.4	6.4	59.2%
野生型	1469	103%	4.1	6.5	6.4	46.7%

注) 比活性: 酵素活性 (U/mL) / A280nm の吸光度 (ABS)

Km (Mal): マルトースに対する Km 値 (mM)

Km (Glc): グルコースに対する Km 値 (mM)

B

変異	比活性	基質特異性	熱安定性
K20E	924	105%	49.7%
Q76M	108	81%	52.3%
Q76G	32	84%	55.1%
K89E + K300R	1038	81%	58.8%
Q168A	333	37%	55.8%
Q246H	686	192%	82.2%
Q168S+L169S	288	33%	73.0%
Q168A+L169D	106	18%	78.8%
Q168S+L169E	270	19%	47.0%
Q168S+L169P	460	25%	47.2%
Q168A+L169G	170	18%	78.3%
野生型	1469	103%	43.4%

注) 比活性: 酵素活性 / A280nm の吸光度

【0048】

Q76Kのグルコース定量性の確認

0.45 U/mL の Q76K を含んだ下記反応試薬を調整した。

50mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH 6.5)

1mM CaCl₂

0.22% Triton-X100

0.4mM PMS

0.26mM WST-1 (水溶性テトラゾリウム塩、同仁化学研究所製)

下記に示すグルコース量の測定方法に従い、試料として精製水、100mg/dl標準液及びグルコース水溶液(600mg/dl)の10水準の希釈系列を測定し、直線性を確認した。

結果を図2に示した。

【0049】

グルコース量の測定方法

試料量3μlに試薬300μlを加え、試薬添加後2分後からの1分間における吸光度変化を求め、精製水及びグルコース100mg/dl標準液での2点検量線に基づき試料中のグルコース量を求めた。尚、測定装置は日立7150形自動分析装置を使用し、測定波長は、主波長480nmのみ、測定温度は37℃で実施した。

図2より、0-600mg/dlの範囲で良好な直線性が確認された。

【0050】

Q76Kのマルトース作用性の確認

0.45U/mlのQ76Kを含んだ下記反応試薬を調整した。

50mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH 6.5)

1mM CaCl₂

0.22% Triton-X100

0.4mM PMS

0.26mM WST-1 (同仁化学研究所製)

サンプルとしては100mg/dlまたは300mg/dlのグルコースをベースに0, 120, 240, 360mg/dlのマルトースを上乗せした物を準備した。上記、グルコース量の測定方法に従い、測定を実施した。

マルトースを含まない100mg/dlグルコース溶液と100とし、ベースに100mg/dlのグルコースを含むサンプルの測定値をそれぞれ相対評価した。同様にマルトースを含まない300mg/dlグルコース溶液と100とし、ベースに300mg/dlのグルコースを含むサンプルの測定値をそれぞれ相対評価した。結果を図3に示す。

【0051】

Q76Eのマルトース作用性の確認

Q76Kのマルトース作用性の確認同様にQ168Eを用いて作用性を評価した。酵素は、0.24U/mlの濃度で添加した。結果を図4に示す。

【0052】

Q168Vのマルトース作用性の確認

Q76Kのマルトース作用性の確認同様にQ168Vを用いて作用性を評価した。酵素は、0.35U/mlの濃度で添加した。結果を図5に示す。

【0053】

Q168Aのマルトース作用性の確認

Q76Kのマルトース作用性の確認同様にQ168Aを用いて作用性を評価した。酵素は、0.6U/mlの濃度で添加した。結果を図6に示す。

【0054】

野生型酵素のマルトース作用性の確認

Q76Kのマルトース作用性の確認同様に野生型酵素を用いて作用性を評価した。酵素は、0.1U/mlの濃度で添加した。結果を図7に示す。

図3、図4、図5、図6、図7より、Q76K、Q76E、Q168V及びQ168Aは野生型酵素に比べ、マルトースに対する作用性が低下していることが確認された。

【0055】

実施例5: 変異ライブラリーの構築とスクリーニング

発現プラスミドpNPG5をテンプレートとして、PCR法により構造遺伝子中の167-169領域にランダム変異を導入した。PCR反応は表3に示す組成の溶液中で、98℃2分間、次に、98℃20秒間、60℃30秒間、及び72℃4分間を30サイクルの条件で行った。

【0056】

【表3】

試薬	液量
KOD Dash DNAポリメラーゼ (2.5 U/ μ l)	1.0 μ l
テンプレートDNA	1.0 μ l
フォワードプライマー (配列番号12に記載)	2.5 μ l
リバースプライマー (配列番号13に記載)	2.5 μ l
10 \times buffer	5.0 μ l
2mM dNTPs	5.0 μ l
H ₂ O	33.0 μ l

【0057】

得られた変異ライブラリーを大腸菌DH5 α に形質転換し、形成された各コロニーを180 μ l/wellのLB培地 (100 μ g/mlのアンピシリンと26 μ MのPQQを含む) の分注されたマイクロタイタープレートに植菌し、37℃、24時間培養した。培養液各50 μ lを別のマイクロタイタープレートに移し、凍結融解の繰り返しによって培養菌体を破碎した後、遠心分離 (2000 rpm、10分間) を行い、上清を回収した。回収した上清を2枚のマイクロタイタープレートに各10 μ l分注した。1枚のマイクロタイタープレートはグルコースを基質とした活性測定試薬を用いて活性測定し、もう一枚はマルトースを基質とした活性測定試薬を用いて活性測定し、反応性を比較した。マルトースに対する反応性の变化したクローンが多数得られた。

マルトースに対する反応性の变化したクローンをLB培地 (100 μ g/mlのアンピシリンと26 μ MのPQQを含む) 5mlの分注された試験管で培養し、確認実験を行ったところ、マルトースに対する反応性の变化したクローンが多数得られた。結果を表4に示す。

【0058】

【表 4】

変異箇所	マルチ作 用性	変異箇所	マルチ作 用性
N167E+Q168G+L169T	64%	N167S+Q168N+L169R	80%
Q168G+L169T	42%	N167G+Q168S+L169Y	55%
N167L+Q168S+L169G	45%	N167G+Q168S+L169S+L174F+K49N	39%
Q168N+L169N+S189R	51%	N167E+Q168G+L169A+S189G	58%
N167G+Q168R+L169A	66%	N167S+Q168G+L169A	48%
N167G+Q168V+L169S	42%	N167S+Q168V+L169S	71%
N167T+Q168I+L169G	42%	N167G+Q168W+L169N	72%
N167G+Q168S+L169N	50%	N167G+Q168S+L169V	36%
Q168R+L169C	29%	N167S+Q168L+L169G	41%
Q168C+L169S	33%	N167T+Q168N+L169K	68%
N167G+Q168T+L169A+S207C	24%	N167A+Q168A+L169P	63%
N167G+Q168S+L169G	34%	N167G+Q168G	46%
N167G+Q168D+L169K	35%	Q168P+L169G	23%
N167G+Q168N+L169S	59%	Q168S+L169G	22%
N188I+T349S	64%	N167G+Q168G+L169A+F215Y	32%
N167G+Q168T+L169G	28%	Q168G+L169V	43%
N167G+Q168V+L169T	43%	N167E+Q168N+L169A	52%
Q168R+L169A	72%	N167G+Q168R	23%
N167G+Q168T	69%	N167G+Q168T+L169Q	72%
Q168I+L169G+K300T	24%	N167G+Q168A	33%
N167T+Q168L+L169K	63%	N167M+Q168Y+L169G	60%
N167E+Q168S	32%	N167G+Q168T+L169V+S189G	42%
N167G+Q168G+L169C	37%	N167G+Q168K+L169D	41%
Q168A+L169D	16%	Q168S+E245D	29%
Q168S+L169S	26%	A351T	74%
N167S+Q168S+L169S	51%	Q168I+L169Q	51%
N167A+Q168S+L169S	40%	Q168A	35%
Q168S+L169P	20%	Q168A+L169G	16%
Q168S+L169E	15%		

【0059】

同様にして67-69領域（フォワードプライマー：配列番号14に記載、リバースプライマー：配列番号15に記載を使用）、129-131領域（フォワードプライマー：配列番号16に記載、リバースプライマー：配列番号17に記載を使用）、341-343領域（フォワードプライマー：配列番号18に記載、リバースプライマー：配列番号1

9に記載を使用)にも変異導入した。また、428と429(フォワードプライマー:配列番号20に記載、リバースプライマー:配列番号21に記載を使用)の間に挿入を試みた。

結果を表5に示す。

【0060】

【表5】

67-69領域

変異箇所	マルトース作用性	変異箇所	マルトース作用性
P67K+E68K	79%	P67R+E68R+I69C	80%
P67D+E68T+I69C	60%		

129-131領域

変異箇所	マルトース作用性	変異箇所	マルトース作用性
E129R+K130G+P131G	73%	E129Q+K130T+P131R	80%
E129N+P131T	67%	E129A+K130R+P131K	70%

341-343領域

変異箇所	マルトース作用性	変異箇所	マルトース作用性
E341L+M342P+A343R	80%	E341S+M342I	80%
A343I	45%	E341P+M342V+A343C	50%
E341P+M342V+A343R	76%	E341L+M342R+A343N	51%

428と429の間に挿入

挿入アミノ酸	マルトース作用性	挿入アミノ酸	マルトース作用性
L	73%	A	71%
K	79%		

【0061】

これらのうち、マルトースに対する作用性が大きく低下している変異体を選抜(Q168S+E245D、Q168A+L169D、Q168S+L169S、Q168S+L169E、Q168A+L169G、Q168S+L169P)し、これらの変異体からプラスミドを抽出し、実施例3並びに実施例4記載の方法に準じてシュードモナスを形質転換してホロ型酵素を発現し、精製酵素を取得して特性を評価した。結果を表6に示す。

【0062】

【表 6】

変異	比活性	基質特異性	Km (Mal)	Km (Glc)	熱安定性
Q168S+E245D	714	29%	24.3	14.4	55.5%
Q168A+L169D	106	18%	65.9	20.8	89.4%
Q168S+L169S	288	33%	55.1	14.4	83.9%
Q168S+L169P	460	25%	87.1	24.1	76.3%
Q168A+L169G	170	18%	60.4	18.6	89.5%
Q168S+L169E	270	19%	70.7	8.9	63.3%
Q168A	313	43%			64.4%
野生型	1469	110%			59.8%

注) 比活性: 酵素活性 (U/ml) / A280nm の吸光度

【0063】

実施例 6: Q168 部位の変異による基質特異性への影響

実施例 5 に記載の方法に準じて、Q168C、Q168D、Q168E、Q168F、Q168G、Q168H、Q168K、Q168L、Q168M、Q168N、Q168P、Q168R、Q168S、Q168T、Q168W、Q168Y の各変異体を調製した。各変異体の調製に使用したプライマーを表 7 に示す。また、調製した各変異体を用い、試験管培養にて調製した破碎液でマルトースに対する反応性を比較した結果を表 8 に示す。更に、各変異体からプラスミドを抽出し、実施例 3 並びに実施例 4 に記載の方法に準じてシュードモナスを形質転換してホロ型酵素を発現し、精製酵素を取得して特性を評価した。結果を表 9 に示す。

【0064】

【表 7】

変異箇所	フォワード プライマー	リバース プライマー
Q 1 6 8 C	配列番号 2 2	配列番号 2 3
Q 1 6 8 D	配列番号 2 2	配列番号 2 4
Q 1 6 8 E	配列番号 2 2	配列番号 2 5
Q 1 6 8 F	配列番号 2 2	配列番号 2 6
Q 1 6 8 G	配列番号 2 2	配列番号 2 7
Q 1 6 8 H	配列番号 2 2	配列番号 2 8
Q 1 6 8 K	配列番号 2 2	配列番号 2 9
Q 1 6 8 L	配列番号 2 2	配列番号 3 0
Q 1 6 9 M	配列番号 2 2	配列番号 3 1
Q 1 6 8 N	配列番号 2 2	配列番号 3 2
Q 1 6 8 P	配列番号 2 2	配列番号 3 3
Q 1 6 8 R	配列番号 2 2	配列番号 3 4
Q 1 6 8 S	配列番号 2 2	配列番号 3 5
Q 1 6 8 T	配列番号 2 2	配列番号 3 6
Q 1 6 8 W	配列番号 2 2	配列番号 3 7
Q 1 6 8 Y	配列番号 2 2	配列番号 3 8

【0065】

【表 8】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
Q 1 6 8 C	5 4 %	Q 1 6 9 M	6 4 %
Q 1 6 8 D	2 9 %	Q 1 6 8 N	8 2 %
Q 1 6 8 E	3 6 %	Q 1 6 8 P	1 0 3 %
Q 1 6 8 F	4 3 %	Q 1 6 8 R	3 6 %
Q 1 6 8 G	4 6 %	Q 1 6 8 S	6 0 %
Q 1 6 8 H	5 5 %	Q 1 6 8 T	9 4 %
Q 1 6 8 K	8 3 %	Q 1 6 8 W	8 7 %
Q 1 6 8 L	9 2 %	Q 1 6 8 Y	9 3 %
野生型	1 0 4 %		

【0066】

【表 9】

変異	比活性	基質特異性	Km (Mal)	Km (Glc)	熱安定性
Q 1 6 8 C	55	5 8 %	20. 4	10. 7	18. 2%
Q 1 6 8 D	102	4 6 %	27. 4	—	61. 4%
Q 1 6 8 E	110	5 1 %	4. 7	8. 6	75. 4%
Q 1 6 8 F	137	5 2 %	36. 4	10. 3	55. 5%
Q 1 6 8 G	667	7 8 %	11. 1	—	78. 7%
Q 1 6 8 H	486	5 8 %	10. 2	5. 4	76. 0%
Q 1 6 8 K	5	8 0 %	9. 6	2. 2	—
Q 1 6 8 L	110	9 6 %	8. 6	4. 3	37. 1%
Q 1 6 9 M	190	6 8 %	22. 7	5. 3	78. 4%
Q 1 6 8 N	68	9 3 %	3. 6	4. 1	—
Q 1 6 8 P	128	1 0 6 %	3. 5	5. 1	82. 3%
Q 1 6 8 R	57	6 0 %	18. 4	3. 8	32. 9%
Q 1 6 8 S	483	8 1 %	12. 5	3. 7	80. 1%
Q 1 6 8 T	11	1 0 3 %	15. 0	6. 9	—
Q 1 6 8 W	287	9 6 %	5. 3	3. 2	59. 2%
Q 1 6 8 Y	297	9 9 %	12. 1	6. 9	100. 0%
野生型	1285	1 0 6 %	3. 8	6. 3	52. 2%

注) 比活性: 酵素活性 (U/ml) / A280nm の吸光度

【0067】

実施例 7: L 1 6 9 部位の変異による基質特異性への影響

実施例 2 に記載の方法に準じて、L 1 6 9 A, L 1 6 9 V, L 1 6 9 H、L 1 6 9 Y、L 1 6 9 K, L 1 6 9 D, L 1 6 9 S, L 1 6 9 N, L 1 6 9 G, L 1 6 9 C の各変異体を調製した。各変異体の調製に使用したプライマーを表 10 に示す。また、調製した各変異体を用い、試験管培養にて調製した破碎液でマルトースに対する反応性を比較した結果を表 11 に示す。

【0068】

【表10】

変異箇所	フォワード プライマー	リバースプライマー
L169A	配列番号39	配列番号39と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L169V	配列番号40	配列番号40と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L169Y	配列番号41	配列番号41と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L169H	配列番号42	配列番号42と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L169K	配列番号43	配列番号43と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L169D	配列番号44	配列番号44と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L169S	配列番号45	配列番号45と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L169N	配列番号46	配列番号46と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L169G	配列番号47	配列番号47と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L169C	配列番号48	配列番号48と相補的な合成オリゴヌクレオチド

【0069】

【表11】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
L169A	59%	L169D	38%
L169V	78%	L169S	57%
L169Y	107%	L169N	74%
L169H	85%	L169G	48%
L169K	60%	L169C	57%
野生型	97%		

【0070】

実施例8: Q168A変異体に対するL169部位の変異の組み合わせによる基質特異性への影響

実施例5に記載の方法に準じて、Q168A+L169A、Q168A+L169C、Q168A+L169E、Q168A+L169F、Q168A+L169H、Q168A+L169I、Q168A+L169K、Q168A+L169M、Q168A+L169N、Q168A+L169P、Q168A+L169Q、Q168A+L169R、Q168A+L169S、Q168A+L169T、Q168A+L169V、Q168A+L169W、Q168A+L169Yの各変異体を調製した。各変異体の調製に使用したプライマーを表12に示す。また、調製した各変異体を用い、試験管培養にて調製した破碎液でマルトースに対する反応性を比較した結果を表13に示す。更に、各変異体からプラスミドを抽出し、実施例3並びに実施例4記載の方法に準じてシュドモナスを形

質転換してホロ型酵素を発現し、精製酵素を取得して特性を評価した。結果を表14に示す。

【0071】

【表12】

変異箇所	フォワード プライマー	リバース プライマー
Q168A+L169A	配列番号12	配列番号49
Q168A+L169C	配列番号12	配列番号50
Q168A+L169E	配列番号12	配列番号51
Q168A+L169F	配列番号12	配列番号52
Q168A+L169H	配列番号12	配列番号53
Q168A+L169I	配列番号12	配列番号54
Q168A+L169K	配列番号12	配列番号55
Q168A+L169M	配列番号12	配列番号56
Q168A+L169N	配列番号12	配列番号57
Q168A+L169P	配列番号12	配列番号58
Q168A+L169Q	配列番号12	配列番号59
Q168A+L169R	配列番号12	配列番号60
Q168A+L169S	配列番号12	配列番号61
Q168A+L169T	配列番号12	配列番号62
Q168A+L169V	配列番号12	配列番号63
Q168A+L169W	配列番号12	配列番号64
Q168A+L169Y	配列番号12	配列番号65

【0072】

【表 13】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
Q168A+L169A	19 %	Q168A+L169P	24 %
Q168A+L169C	7 %	Q168A+L169Q	42 %
Q168A+L169E	17 %	Q168A+L169R	42 %
Q168A+L169F	22 %	Q168A+L169S	14 %
Q168A+L169H	21 %	Q168A+L169T	24 %
Q168A+L169I	43 %	Q168A+L169V	34 %
Q168A+L169K	21 %	Q168A+L169W	33 %
Q168A+L169M	22 %	Q168A+L169Y	37 %
Q168A+L169N	19 %	野生型	104 %

【0073】

【表 14】

変異	比活性	基質特異性	Km (Mal)	Km (Glc)	熱安定性
Q168A+L169A	154	19 %	126	33.0	86.2 %
Q168A+L169C	63	13 %	103	35.6	100.0 %
Q168A+L169E	90	19 %	8.6	20.4	100.0 %
Q168A+L169F	138	27 %	44.7	10.4	80.4 %
Q168A+L169H	70	27 %	99.2	15.5	100.0 %
Q168A+L169I	43	53 %	12.5	6.0	28.7 %
Q168A+L169K	129	20 %	20.4	26.7	100.0 %
Q168A+L169M	80	23 %	52.3	15.6	—
Q168A+L169N	167	22 %	59.1	34.5	83.5 %
Q168A+L169P	377	24 %	58.0	13.9	79.9 %
Q168A+L169Q	117	49 %	156.9	5.4	100.0 %
Q168A+L169R	32	45 %	59.0	9.6	100.0 %
Q168A+L169S	42	24 %	15.6	21.0	—
Q168A+L169T	98	23 %	33.5	15.2	83.7 %
Q168A+L169V	41	27 %	49.1	24.7	40.4 %
Q168A+L169W	91	38 %	63.3	10.8	49.4 %
Q168A+L169Y	31	52 %	13.6	11.6	74.3 %
野生型	1285	106 %	3.8	6.3	52.2 %

注) 比活性: 酵素活性 (U/ml) / A280nm の吸光度

【0074】

実施例 9: A170 部位の変異による基質特異性への影響

実施例 2 に記載の方法に準じて、A170C、A170D、A170E、A170F、A170G、A170H、A170K、A170L、A170M、A170N、A170P、A170R、A170S、A170T、A170W、A170Y、A170V、A170I、A170Q の各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号 69 記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号 69 と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。調製した変異ライブラリーをスクリーニングして目的の変異体を取得した。試験管培養にて調製した破碎液を用いてマルトースに対する反応性を比較した結果を表 15 に示す。

【0075】

【表 15】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
A170G	98%	A170K	87%
A170V	91%	A170R	108%
A170L	86%	A170C	92%
A170I	85%	A170M	90%
A170S	100%	A170F	82%
A170T	92%	A170Y	88%
A170D	102%	A170W	79%
A170E	103%	A170H	98%
A170N	100%	A170P	28%
A170Q	99%	野生型	98%

【0076】

実施例 10: E245 部位の変異による基質特異性への影響

実施例 2 に記載の方法に準じて、E245C、E245D、E245A、E245F、E245G、E245H、E245K、E245L、E245M、E245N、E245P、E245R、E245S、E245T、E245W、E245Y、E245V、E245I、E245Q の各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号 70 記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号 70 と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。調製した変異ライブラリーをスクリーニングして目的の変異体を取得した。試験管培養にて調製した破碎液を用いてマルトースに対する反応性を比較した結果を表 16 に示す。

【0077】

【表 16】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
E245A	99%	E245Q	72%
E245D	49%	E245S	98%
E245F	64%	E245T	89%
E245H	54%	E245V	85%
E245I	114%	E245W	92%
E245K	活性消失	E245Y	活性消失
E245L	活性消失	E245R	94%
E245M	69%	E245G	92%
E245N	59%	E245C	75%
E245P	活性消失	野生型	99%

【0078】

実施例 11: N249 部位の変異による基質特異性への影響

実施例 2 に記載の方法に準じて、N249C、N249D、N249A、N249F、N249G、N249H、N249K、N249L、N249M、N249E、N249P、N249R、N249S、N249T、N249W、N249V、N249I、N249Q の各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号 71 記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号 71 と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。調製した変異ライブラリーをスクリーニングして目的の変異体を取得した。試験管培養にて調製した破碎液を用いてマルトースに対する反応性を比較した結果を表 17 に示す。

【0079】

【表 17】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
N249G	82%	N249K	184%
N249A	77%	N249R	191%
N249V	157%	N249C	107%
N249L	94%	N249M	170%
N249I	137%	N249F	活性消失
N249S	活性消失	N249W	活性消失
N249T	活性消失	N249H	343%
N249D	活性消失	N249P	活性消失
N249E	86%	野生型	106%
N249Q	79%		

【0080】

実施例 12: E245D 変異の組み合わせによる基質特異性への影響

実施例 2 に記載の方法に準じて、(Q168A+L169G+E245D)、(Q168A+L169P+E245D) の各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号 72 記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号 72 と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。また、鋳型 DNA としては実施例 8 で取得した (Q168A+L169G) または (Q168A+L169P) の plasmid を使用した。調製した変異体を、試験管培養にて調製した破碎液でマルトースに対する反応性を比較した結果を表 18 に示す。

【0081】

【表 18】

変異体	マルトース 作用性	変異体	マルトース 作用性
Q168A+L169G+E245D	14%	Q168A+L169G+E245D	18%
野生型	104%		

【産業上の利用可能性】

【0082】

本発明によれば、基質特異性及び／又は熱安定性が改善された PQQGDH を得ることができる。この改変型 PQQGDH は、グルコースアッセイキット、グルコースセンサに利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】Q76N、Q76E、Q168I、Q168V、Q76T、Q76M、Q168A、野生型、Q76G、Q76Kの至適pHの測定結果を示す。横軸はpH、縦軸は相対活性を示す。図中、黒丸（Acetate）が0.22% Triton-X100を含む50mM 酢酸緩衝液（pH3.0～6.0）で酵素活性を測定した結果である。同様に、黒四角（PIPES）が0.22% Triton-X100を含む50mM PIPES-NaOH緩衝液（pH6.0～7.0）、黒三角（K-PB）が0.22% Triton-X100を含む50mMリン酸緩衝液（pH5.0～8.0）、黒菱形（Tris-HCl）が0.22% Triton-X100を含む50mM トリス塩酸緩衝液（pH7.0～9.0）中でそれぞれ酵素活性を測定した結果である。なお測定値は最大活性を示したものを100%とした相対値で示している。

【図2】Q76Kのグルコース定量性の確認結果を示す。横軸は1水準の希釈系列、縦軸はグルコース濃度の測定値（mg/dl）を示す。

【図3】Q76Kのマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度（mg/dl）、縦軸はマルトース添加濃度が0のときの測定値を100%としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして100mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして300mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

【図4】Q76Eのマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度（mg/dl）、縦軸はマルトース添加濃度が0のときの測定値を100%としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして100mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして300mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

【図5】Q168Vのマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度（mg/dl）、縦軸はマルトース添加濃度が0のときの測定値を100%としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして100mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして300mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

【図6】Q168Aのマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度（mg/dl）、縦軸はマルトース添加濃度が0のときの測定値を100%としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして100mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして300mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

【図7】野生型酵素のマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度（mg/dl）、縦軸はマルトース添加濃度が0のときの測定値を100%としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして100mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして300mg/dlのグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Toyo Boseki Kabushiki Kaisya
 <120> PQQ dependent glucose dehydrogenase
 <130> 03-0611
 <160> 72
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Acinetobacter baumannii
 <400> 1

Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr Glu Asn
 1 5 10 15

Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu
 20 25 30

Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly
 35 40 45

Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe
 50 55 60

Gln Val Pro Glu Ile Val Ser Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu
 65 70 75 80

Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile
 85 90 95

Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn
 100 105 110

Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe
 115 120 125

Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His
130 135 140

Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr
145 150 155 160

Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn
165 170 175

Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr
180 185 190

His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Val
195 200 205

Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr
210 215 220

Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys
225 230 235 240

Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu
245 250 255

Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys
260 265 270

Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys
275 280 285

Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly
290 295 300

Val Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro
305 310 315 320

Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp
325 330 335

Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro
340 345 350

Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp
355 360 365

Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg
370 375 380

Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro
385 390 395 400

Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu
405 410 415

Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys
420 425 430

Asp Asp Gly Ser Val Thr His Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile
435 440 445

Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys
450 455

<210> 2

<211> 1368

<212> DNA

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 2

gatatacctc tgacacctgc tcagttcgca aaagcgaaaa cagaaaattt tgataaaaaa 60

gtgattctgt ccaatttaaa taaaccacat gctttgttat gggggccaga taatcaaatt 120

tggttaaccg aacgtgcaac tggcaaaatt ttaagagtaa atcctgtatc tggtagcgcg 180

aaaacagtat ttcaggttcc tgaaattgtg agtgatgctg atgggcaaaa tggtttgta 240

ggttttgctt ttcatcctga ctttaaacad aacccttata tctatatitc aggcactttt 300
 aaaaatccaa aatctacaga taaagagtta cctaatacaga cgattattcg tagatatacc 360
 tataataaaa ctacagatac atttgaaaag cctattgatt tgattgcagg tttaccgtca 420
 tcaaaagatc atcagtctgg tcgtctcggt attgggtccag accaaaaaat ctactatacg 480
 attgggtgacc aaggctgtaa tcagttagct tatctgttct taccgaatca ggcacagcat 540
 actccgactc agcaagagct caatagtaaa gactaccata catatatggg taaagtatta 600
 cgcttaaadc tggacggcag tgtacctaaa gacaacccaa gctttaacgg cgtagtgagt 660
 catatctaca ctttagggca ccgtaatcca caaggtttag catttgcccc aaatggaaag 720
 cttttacaat ctgagcaagg accaaattct gatgatgaaa ttaaccttgt attaaaaggt 780
 ggtaactatg gctggccaaa ttagcttggt tataaagatg acagtgggta tgcctatgca 840
 aactattcgg cagcaaccaa taaatcaca attaaagatt tagctcaaaa cgggataaaa 900
 gtagcaacag gtgttcctgt gactaaagag tctgaatgga ctggtaaaaa ctttgtgccg 960
 ctttgaaaa ctttatatac ggtacaagat acctataact ataatgacc tacttgttgt 1020
 gagatggcat atatttgctg gccaacgggt gcaccgtcat cagcatatgt atatacggga 1080
 ggcaaaaaag cgattccagg gtgggaaaat acattattgg tcccatcttt aaaacgtggg 1140
 gtgattttcc gtattaaatt ggacccgaca tatagcacga ctttgatga tgctatccca 1200
 atgtttaaaa gcaataaccg ttatcgtgat gtcacgcta gtccagaagg taatacctta 1260
 tatgtgctga ctgatacagc ggggaatgta caaaaagatg atggttctgt cactcatact 1320
 ttagagaatc ccggttctct cattaaattt acatataacg gtaagtaa 1368

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 3

agtgatgctg atgggaataa tggtttgta ggt

33

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 4
agtgatgctg atggggagaa tggtttgta ggt 33

<210> 5
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 5
agtgatgctg atgggacaaa tggtttgta ggt 33

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 6
agtgatgctg atgggatgaa tggtttgta ggt. 33

<210> 7
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 7
agtgatgctg atggggggaa tggtttgta ggt 33

<210> 8

<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 8
agtgatgctg atgggaagaa tggtttgta ggt 33

<210> 9
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 9
gaccaaggctc gtaatatttt agcttatctg ttc 33

<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 10
gaccaaggctc gtaatgtatt agcttatctg ttc 33

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 11
gaccaaggctc gtaatgcatt agcttatctg ttc 33

<210> 12
<211> 43
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 12

cgaatcaggc acagcatact ccgactcagc aagagctcaa tag

43

<210> 13

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(25)

<223> n stands for any base

<400> 13

gtaagaacag ataagcnnnn nnnnnacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 14

gatgctgatg ggcaaaatgg tttgttaggt tttgcttttc

40

<210> 15

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(15)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(15)

<223> n stands for any base

<400> 15

actcacnnnn nnnnnaacct gaaatactgt tttcgcg

38

<210> 16

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 16

tttaccgtca tcaaaagatc atcagtctgg tcgtctcggtt attggtccag

50

<210> 17

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(26)

<223> n stands for any base

<400> 17

cctgcaatca aatcaatnnn nnnnnnaaat gtatctgtag ttttattata gg

52

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 18
acggttgac cgatcatcagc atatgtatat acgggaggc

39

<210> 19
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(24)
<223> n stands for any base

<400> 19
tggccagcaa atatannnnn nnnnaccaca agtagggtc

39

<210> 20
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 20
atggttctgt cactcatact ttagagaatc ccgg .

34

<210> 21
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(19)
<223> n stands for any base

<400> 21
catctttttg tacattnnnc cccgctgtat cagtc

35

<210> 22
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 22
ttaccgaatc aggcacagca tactccgact cag 33

<210> 23
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 23
gaacagataa gctaagcaat tacgaccttg gtc 33

<210> 24
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 24
gaacagataa gctaartcat tacgaccttg gtc 33

<210> 25
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 25
gaacagataa gctaaytcat tacgaccttg gtc 33

<210> 26
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 26
gaacagataa gctaaraaat tacgaccttg gtc 33

<210> 27
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 27
gaacagataa gctaagccat tacgaccttg gtc 33

<210> 28
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 28
gaacagataa gctaartgat tacgaccttg gtc 33

<210> 29
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 29
gaacagataa gctaayttat tacgaccttg gtc 33

<210> 30
<211> 33

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n stands for any base

<400> 30
gaacagataa gctaanagat tacgaccttg gtc

33

<210> 31
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 31
gaacagataa gctaacatat tacgaccttg gtc

33

<210> 32
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 32
gaacagataa gctaarttat tacgaccttg gtc

33

<210> 33
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature

<222> (16)..(16)
<223> n stands for any base

<400> 33
gaacagataa gctaanggat tacgaccttg gtc 33

<210> 34
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> n stands for any base

<400> 34
gaacagataa gctaancgat tacgaccttg gtc 33

<210> 35
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 35
gaacagataa gctaagctat tacgaccttg gtc 33

<210> 36
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 36
gaacagataa gctaacgtat tacgaccttg gtc 33

<210> 37
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 37
gaacagataa gctaaccaat tacgaccttg gtc 33

<210> 38
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 38
gaacagataa gctaartaat tacgaccttg gtc 33

<210> 39
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 39
gaccaaggtc gtaatcaggc agcttatctg ttcttaccg 39

<210> 40
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 40
gaccaaggtc gtaatcaggt tgcttatctg ttcttaccg 39

<210> 41
<211> 39

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 41
gaccaaggtc gtaatcagta tgcttatctg ttcttaccg 39

<210> 42
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 42
gaccaaggtc gtaatcagca tgcttatctg ttcttaccg 39

<210> 43
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 43
gaccaaggtc gtaatcagaa agcttatctg ttcttaccg 39

<210> 44
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 44
gaccaaggtc gtaatcagga tgcttatctg ttcttaccg 39

<210> 45
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 45
gaccaaggtc gtaatcagtc agcttatctg ttcttaccg 39

<210> 46
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 46
gaccaaggtc gtaatcagaa tgcttatctg ttcttaccg 39

<210> 47
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 47
gaccaaggtc gtaatcaggg agcttatctg ttcttaccg 39

<210> 48
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 48
gaccaaggtc gtaatcagtg tgcttatctg ttcttaccg 39

<210> 49
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n stands for any base

<400> 49

gtaagaacag ataagcngat gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 50

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 50

gtaagaacag ataagcrgat gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 51

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 51

gtaagaacag ataagcytct gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 52

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 52

gtaagaacag ataagcraat gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 53

<211> 45

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 53
gtaagaacag ataagcrtgt gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 54
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 54
gtaagaacag ataagcdatt gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 55
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 55
gtaagaacag ataagcyttt gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 56
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 56
gtaagaacag ataagccatt gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 57
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 57

gtaagaacag ataagcrttt gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 58

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n stands for any base

<400> 58

gtaagaacag ataagcnggt gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 59

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 59

gtaagaacag ataagcytgt gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 60

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> n stands for any base

<400> 60
gtaagaacag ataagcncgt gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 61
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n stands for any base

<400> 61
gtaagaacag ataagcngat gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 62
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n stands for any base

<400> 62
gtaagaacag ataagcngtt gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 63
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> n stands for any base

<400> 63
gtaagaacag ataagcnact gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 64
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 64
gtaagaacag ataagcccat gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 65
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 65
gtaagaacag ataagcrtat gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 66
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 66
gaccaaggtc gtaatagtga ggcttatctg ttctta 36

<210> 67
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 67
gaccaagggtc gtaatagtcg cgcttatctg ttctta 36

<210> 68
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 68
gaccaagggtc gtaatgcagg cgcttatctg ttctta 36

<210> 69
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n stands for any base

<400> 69
caagggtcgta atcagttann statctgttc ttaccgaat 39

<210> 70
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n stands for any base

<400> 70
ggaaagcttt tacaatctnn scaaggacca aattctgat

39

<210> 71
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> n stands for any base

<400> 71
caatctgagc aaggaccann stctgatgat gaaattaac

39

<210> 72
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

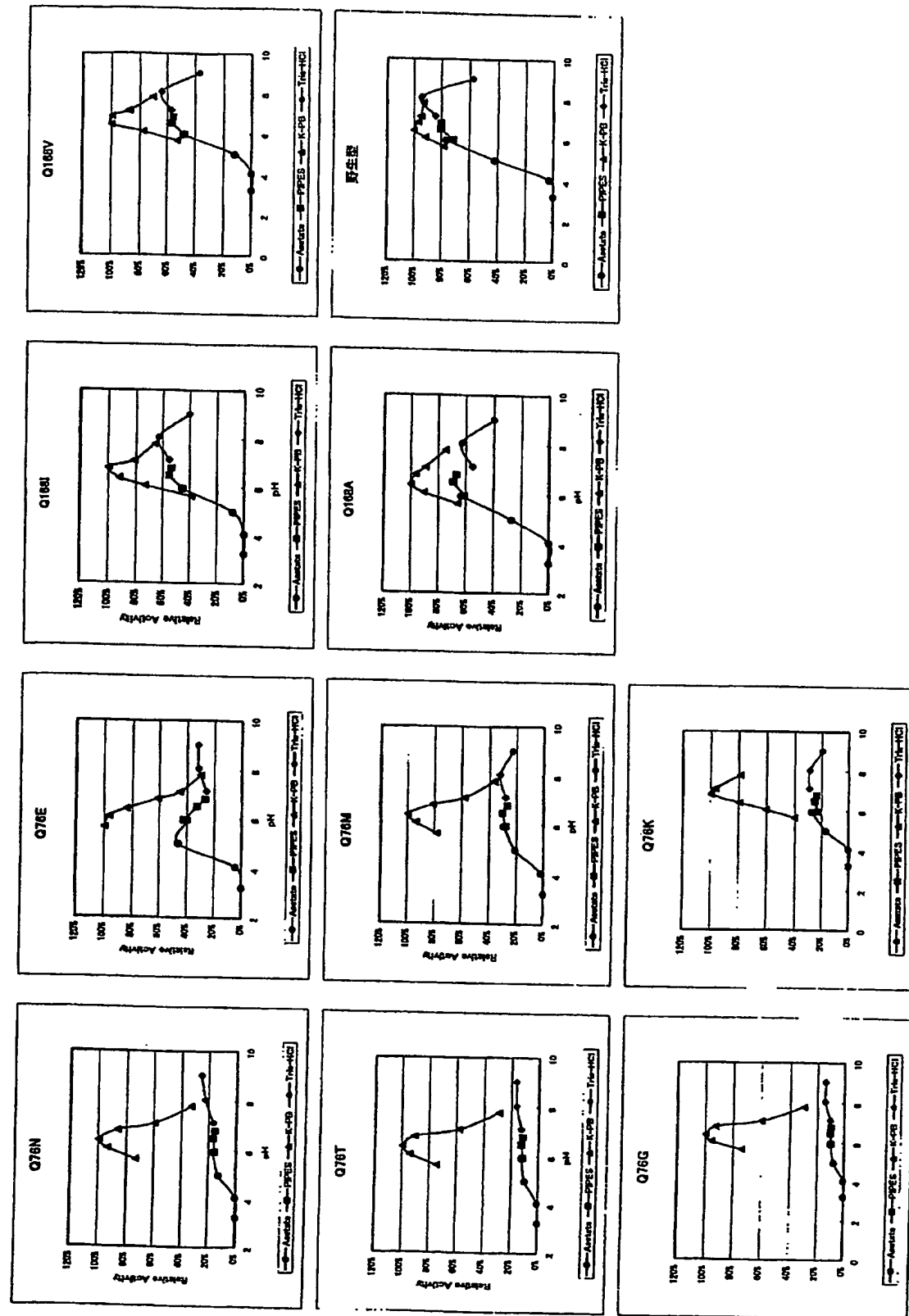
<220>
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 72
gcttttaca tctgaccaag gaccaaattc tgatgatg

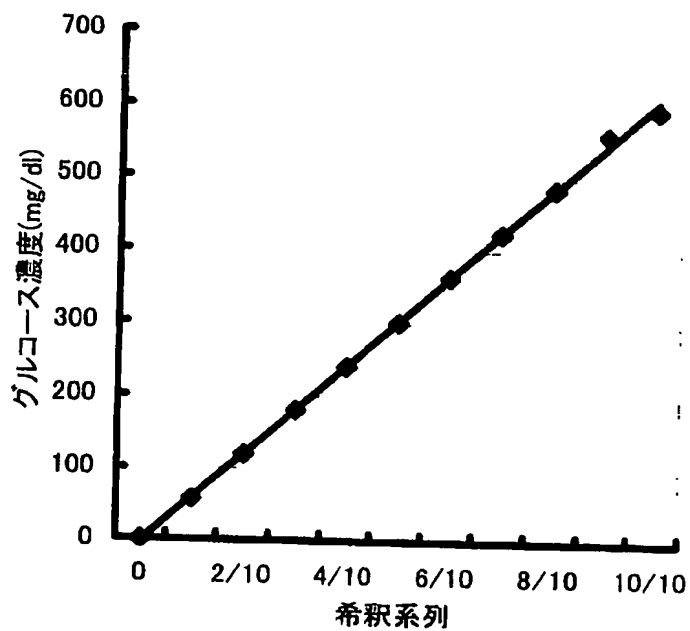
38

【書類名】 図面

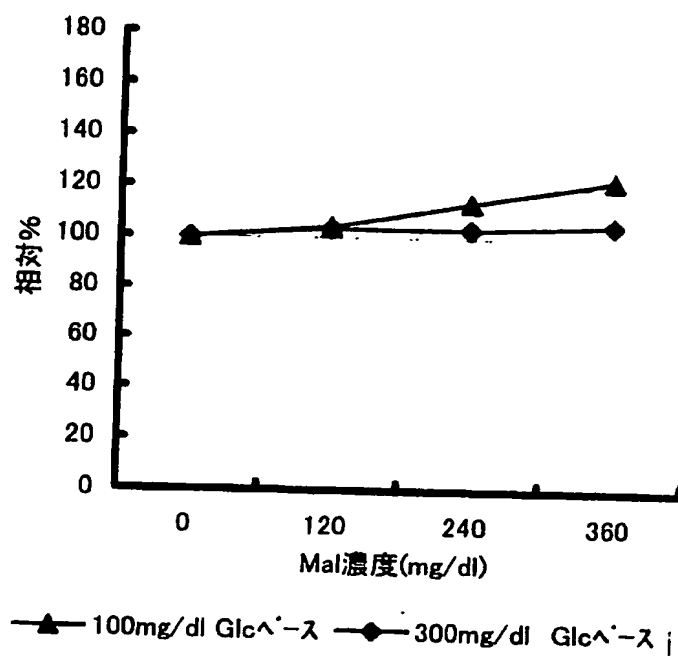
【図1】



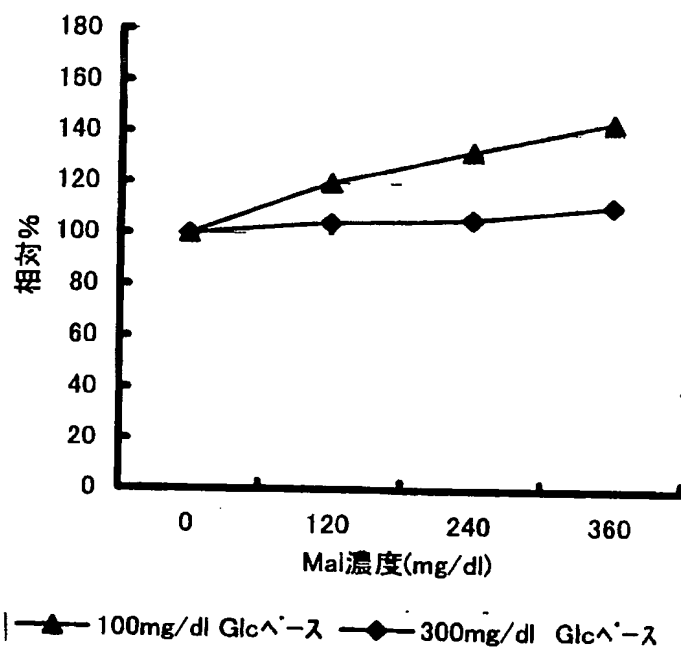
【図 2】



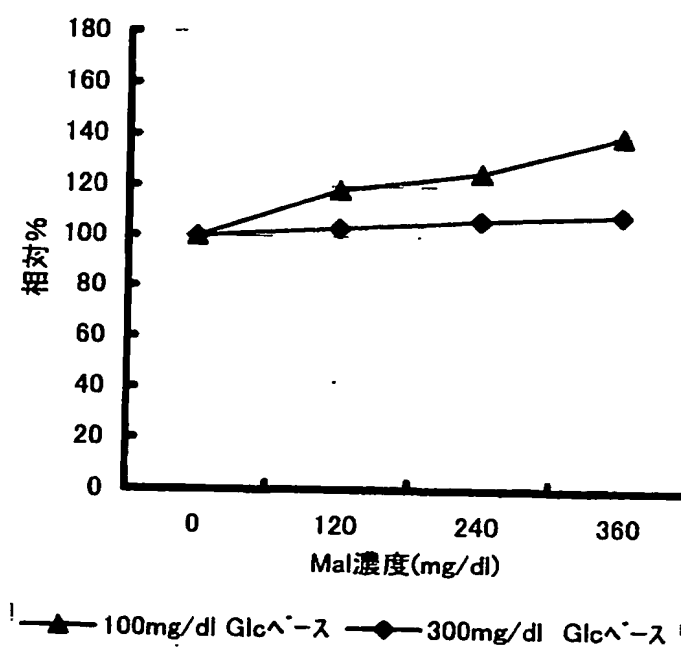
【図 3】



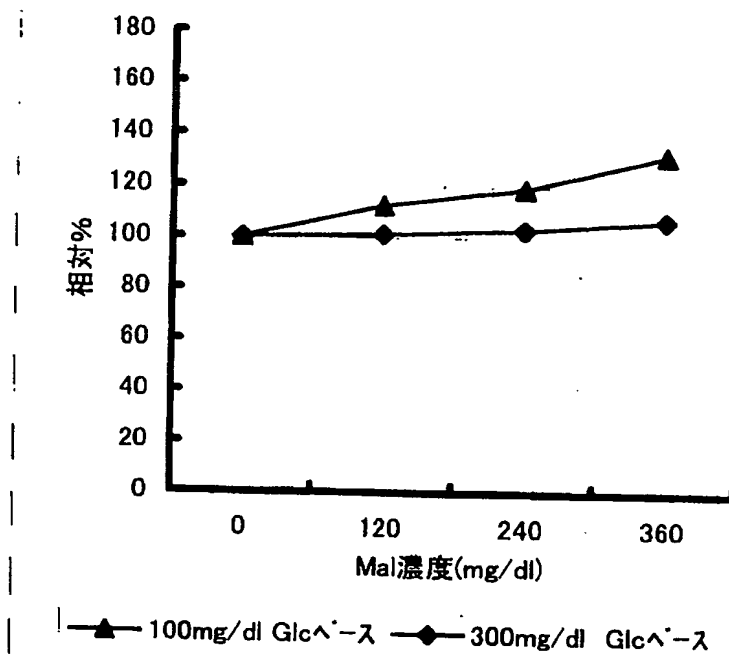
【図 4】



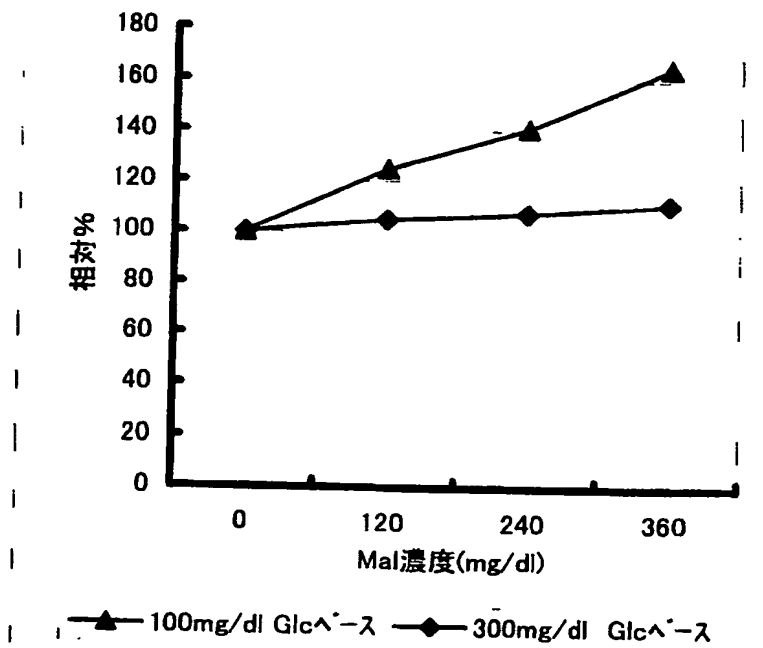
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 基質特異性及び／又は熱安定性が改善されたPQQGDHを提供する。

【解決手段】 本発明は、野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（PQQGDH）よりも二糖類に対する作用性が低下した改変型PQQGDH、及び／または、野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（PQQGDH）よりも安定性が向上した改変型PQQGDH。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-315797
受付番号	50301486656
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 9月11日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 9月 8日

特願 2 0 0 3 - 3 1 5 7 9 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 3 1 6 0]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号

氏 名

東洋紡績株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.